云 南 植 物 研 究 2009，31 (4)：326～334
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724 SP.J.1143.2009.09033

拟南芥神经酰胺酶基因对氧化胁迫的响应

刘润华[1,2]，江文波[1,2]，余迪求[1]
(1 中国科学院西双版纳热带植物园，云南 昆明 650223；2 中国科学院研究生院，北京 100049)

摘要：以拟南芥哥伦比亚生态型 (Col) 和神经酰胺酶突变体为实验材料，通过对突变体的一系列生理生化指标的测定，来研究拟南芥神经酰胺酶基因 (*AtCER*) 对 H_2O_2 的响应。利用 PCR 和 Northern blot 获得了 9 个 *AtCER* 纯合单突变体。不同浓度 H_2O_2 处理野生型和突变体后，发现突变体对 H_2O_2 的反应比野生型更加敏感。H_2O_2 处理后突变体叶片出现比野生型更严重的黄化现象和坏死斑点，总叶绿素含量也比野生型下降的更快，电导率测定也发现突变体比野生型的电导率增加得更多。抗氧化酶活性的分析结果发现 H_2O_2 处理后，突变体的抗氧化酶活性比野生型提高了 1.5～3 倍。上述研究结果说明 *AtCER* 参与了 H_2O_2 诱导的氧化胁迫反应。

关键词：拟南芥；神经酰胺；神经酰胺酶；H_2O_2
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700 (2009) 04-326-09

The Response of *AtCER* to Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*

LIU Run-Hua[1,2]，JIANG Wen-Bo[1,2]，YU Di-Qiu[1**]
(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*，*Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650223，China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*，Beijing 100049，China)

Abstract：Ceramide is a second messenger involved in many significant signal pathways of plants，such as cell growth，reduplication，differentiation，senescence and apoptosis. This work investigated the *AtCER* function in oxidative stress caused by H_2O_2. The leaves of *AtCER* mutants *cer*1，*cer*2 and *cer*3，exhibited more severe levels of yellowing and necrotic lesions than wild-type with H_2O_2 treatment. Further investigation by the physiological and biochemical methods，indicated that chlorophyll content of these mutants decreased more quickly than do wild type plants，and their conductivity increased significantly，and the antioxidases activity in leaves of *AtCER* mutants were approximately 1.5 or 3-fold higher than that in wild-type after H_2O_2 treatment. All of those results suggested that *AtCER* may involved in H_2O_2-induced Oxidative stress.
Key words：*Arabidopsis thaliana*；Ceramide；Ceramidease；Hydrogen peroxide

神经酰胺 (Ceramide) 是鞘脂 (Sphingolipids) 的基本结构单位，由鞘氨醇长链上的氨基与一分子脂肪酸以酰胺键共价结合而生成。许多研究表明，神经酰胺是鞘脂信号途径的中心分子，在植物许多信号途径中充当第二信使的重要作用，调控细胞的功能如细胞生长、增殖、分化、衰老和凋亡等信号过程 (Lynch and Dunn，2004；Sperling and Heinz，2003；Dunn 等，2004)。研究证实神经酰胺介导一些拮抗剂可以引起细胞分化、抑制细胞生长、促进程序性细胞死亡和衰

基金项目：国家高科技研究发展计划 (863 计划) (2006AA02Z129)、国家自然科学基金 (90408022)、科技部项目 (2005DKA21006) 和中国科学院“百人计划”择优支持
通讯作者：Author for correspondence；E-mail：ydq@xtbg.ac.cn；Tel：0871-5143017
收稿日期：2009-02-23，2009-03-30 接受发表
作者简介：刘润华 (1982-) 女，在读硕士研究生，主要研究方向：植物基因功能分析。

老（Venable等，2006），神经酰胺和它的磷酸化衍生物之间的动态平衡能调控植物程序性细胞死亡的总量（Liang等，2003）。神经酰胺及其代谢产物在许多方面的功能也是相互作用的，如神经酰胺和鞘氨醇-1-磷酸（Sphinganine-1-phosphate）在凋亡信号调节方面的功能是相互拮抗的，神经酰胺在不同细胞类型中都促进细胞死亡，但细胞内的鞘氨醇-1-磷酸却能刺激细胞生长和抑制程序性死亡的信号途径（Morita等，2000；Xia等，2000）。近10年来的研究发现神经酰胺也参与与人类健康密切相关的生理病理过程，如癌症、病毒或细菌感染、动脉硬化和心血管炎症、提高免疫等（Li等，2007；Heung等，2006）。

神经酰胺水平的调节受多种酶的调控，目前已克隆出一些神经酰胺相关酶。神经酰胺酶(Ceramidase)是以神经酰胺为中心的鞘脂代谢途径的重要组成部分，它水解神经酰胺生成脂肪酸和长链基团（Wright等，2003；Bromley等，2003；Neill等，2002）。但是植物神经酰胺酶的功能目前还不清楚。

过氧化氢（H_2O_2）是活性氧簇（ReActive Oxygen Species，ROS）的一种，是细胞有氧代谢的产物，许多外界刺激（如紫外辐射、热激、机械损伤、水分缺乏、病原菌等）或细胞内信号分子都可以导致细胞内H_2O_2的积累（Zhang等，2003；Kwak等，2003；Park等，2003；Yoshioka等，2003；Cheng and Song，2006）。许多证据表明H_2O_2在信号转导途径中作为第二信使参与细胞程序性死亡、激素响应、生物和非生物胁迫响应等（Laloi等，2004；Foreman等，2003；Finkel，2006；Rhee，2006；Rahman等，2005；Kotchoni and Gachomo，2006）。H_2O_2可引起细胞内游离Ca^{2+}浓度增加，从而导致气孔关闭。在ABA诱导气孔关闭的过程中也发现了过氧化氢酶相关基因的表达，表明H_2O_2可能是信号转导链的一个中间环节。H_2O_2还能调控Ca^{2+}信号系统、胞质碱化以及K^+通道的变化（Pei等，2000；Zhang等，2001a，b；Zhang等，2008）。高浓度H_2O_2可以直接损伤许多细胞内的生物大分子，使细胞膜遭受损害，从而加速细胞的衰老和解体，最终导致细胞死亡；低浓度H_2O_2却能促进细胞生长，增强植物对多种外界逆境和病原菌的抵抗力（Huwiler等，2000；Kwak等，2003）。此外，H_2O_2能正调控与抗氧化防御系统相关基因的表达，而且拟南芥中已经鉴定出175个受H_2O_2调控的不可逆表达序列，其中有113个受诱导，62个被抑制（Sung等，2008；Desikan等，2001；Mullineaux等，2000）。因此H_2O_2是研究细胞对氧化胁迫响应的一个重要活性分子。

神经酰胺酶是调控神经酰胺水平的关键酶，所以神经酰胺酶的相关代谢功能和生物学功能的研究非常必要而且重要。但是到目前为止，动物方面关于神经酰胺酶的功能还不太清楚，植物神经酰胺酶的功能也未见报道。因此本文以拟南芥神经酰胺酶突变体为实验材料，选用拟南芥野生型（*Col*）作对照实验材料。通过对H_2O_2处理后突变体和野生型叶片的一系列生理生化指标的测定(如叶绿素含量、电导率、抗氧化酶活性等)，我们发现*AtCER*参与了H_2O_2诱导的氧化胁迫反应。

1 材料与方法

1.1 植物材料和培养条件

拟南芥野生型（*Col*）和拟南芥神经酰胺酶突变体种子经表面灭菌后点播在1 2 MS培养基（含0.65% Agar）上，4℃春化2 d后，转移到26℃光照培养箱生长一周，然后移栽到土里，于14 h光照10 h黑暗条件的22℃温室中生长。

为了避免植物发育对实验的影响，本实验中所用的叶片材料选用第三片莲座叶，在其叶片出现后的12天，子叶完全展开时取材。用于H_2O_2处理的拟南芥幼苗叶片取材后，立即以叶正面朝下，背面朝上漂浮在不同浓度H_2O_2（含3 mmol L^{-1} pH = 5.8 MES buffer）的玻璃培养皿中，放入22℃全光照（光照强度12 000 lx）培养箱中处理相应时间。用于Northern杂交的材料为生长4周后经3% H_2O_2喷洒处理8 h的整株幼苗。

1.2 Northern blot

用H_2O_2处理突变体和野生型幼苗，提取总RNA。使用1.5%甲醛-MOPS琼脂糖凝胶分离RNA，转移到尼龙膜上压膜16 h。分别用*AtCER*三个基因的PCR产物做为探针，探针通过Klenow fragment（Takara）进行^{32}P-dATP标记，选用PerfectHyb™ Plus buffer（Sigma-Aldrich）杂交液于68℃杂交过夜。然后洗膜，压片放射自显影。

1.3 植物叶片内源H_2O_2含量的测定

称取生长20 d的新鲜拟南芥叶片0.1 g左右，加入

4℃预冷的丙酮和少许石英砂研磨成匀浆，转入离心管，8 000 r min^{-1}离心10 min，弃去残渣，留上清液。取上清液加入5%硫酸钛和浓氨水，形成沉淀后于8 000 r min^{-1}离心10 min，弃上清液。沉淀用丙酮反复洗涤3～5次，直到去除色素。在洗涤后的沉淀中加入2 mol L^{-1}硫酸，待完全溶解后，在415 nm波长下比色。

1.4 电导率的测定

用不同浓度H_2O_2处理拟南芥第三片莲座叶一天，然后用电导率仪测定溶液的电导率。

1.5 总叶绿素含量的测定

取H_2O_2处理的拟南芥叶片加入80%丙酮溶液，于干净的研钵中快速研磨成匀浆后转移到装有滤纸的漏斗内过滤。收集滤液于625 nm波长下比色，以测定叶片的总叶绿素含量。

1.6 酶的提取和分析

称取H_2O_2处理后的拟南芥叶片0.1 g左右，加入50 mmol L^{-1}（pH = 7）含1%PVP的冰磷酸提取液，于冰冻的研钵中快速研磨成匀浆后倒入离心管中，4℃，10 000 r min^{-1}离心10 min，弃残渣，留上清液作为粗酶液测定超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）、抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性。在酶活性测定前，用考马斯亮兰法测定各个样品的总蛋白浓度，对各个样品的总蛋白浓度归一化。SOD酶活性测定参照Giannoplitis and Ries（1977）的方法；POD酶活性测定参照陈少裕（1991）的方法；CAT酶活性测定参照Beers and Sizer（1952）的方法；APX酶活性测定参照沈文飚等（1996）的方法。

2 结果与分析

2.1 拟南芥神经酰胺酶基因突变体的获得

拟南芥神经酰胺酶基因家族有三个成员，*CER*1（*Atceramidase*1），*CER*2（*Atcerami-dase*2）和*CER*3（*Atceramidase*3）。根据神经酰胺酶的最适pH值，分为酸性、中性和碱性神经酰胺酶，拟南芥三个神经酰胺酶均为中性 碱性神经酰胺酶（Dangl等，2000）。

*cer*突变体从The Arabidopsis Biological Resource Center（ABRC）获得（Alonso等，2003）。根据T-DNA插入位置，我们设计了特异引物进行PCR扩增，同时利用基因特异性引物和KO引物（AAACGTCCGCAATGTGTTAT）再次验证，获得了纯合插入突变体。为了进一步验证，我们采用300 bp左右的探针，进行Northern blot分析。用该基因T-DNA插入位点后的下游片断作为探针，以避免和排除实验中假阳性的杂交条带。Northern blot结果如图1，野生型（wt）有条带，而突变体没有条带。根据实验结果我们获得了拟南芥神经酰胺酶三个基因的9个T-DNA插入单突变体，其中*cer*1有5个，*cer*2有2个，*cer*3有2个（图2）。这9个T-DNA插入单突变体的基因位点和编号，以及PCR筛选的引物序列见表1。

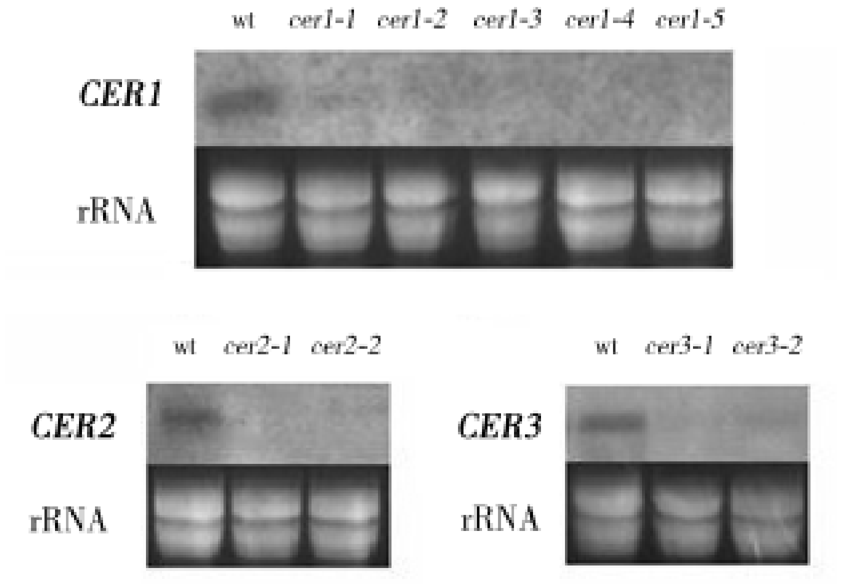

图1 拟南芥神经酰胺酶基因突变体的Northern blot鉴定

Fig.1 Characterization of T-DNA insertion mutants of *AtCER*

2.2 *cer*突变体对H_2O_2的响应更敏感

动物方面的研究已经证实神经酰胺酶参与调控细胞的衰老（Venable等，2006；Futerman and Hannun，2004），而氧化胁迫导致植物受损，是植物叶片衰老的主要原因之一（Quirino等，2000；Woo等，2004），因此我们首先检测了突变体和野生型叶片对不同浓度H_2O_2处理的反应，以了解神经酰胺酶基因是否参与了H_2O_2引起的氧化胁迫。由于各个基因中不同插入位点的突变体对H_2O_2的敏感性基本一致，因此每个基因都只选取一个突变体来进行实验。本文所用的三个突变体分别是：*cer*1（SALK_020682），*cer*2（SALK_054725），*cer*3（SALK_087134）。

将突变体和野生型叶片于0、10、20、30、40 mmol L^{-1} H_2O_2（含3 mmol L^{-1} pH = 5.8 MES buffer）中处理4天。从图3可以明显看出三个突变体在H_2O_2处理后表现出比野生型更严重的黄化现象和坏死斑点。*cer*3在10 mmol L^{-1} H_2O_2处理下就开始出现黄化现象和坏死斑，而且随着H_2O_2浓度的提高，其黄化和坏死程度逐渐加重。

*cer*1、*cer*2 的表型虽然比 *cer*3 轻一些，但其黄化和坏死程度仍然比野生型强，在 30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理条件下突变体和野生型的黄化和坏死现象差异最明显。这些结果表明：与野生型相比，*cer* 对 H_2O_2 的响应更敏感。

同时我们对突变体和野生型叶片的内源 H_2O_2 含量也进行了分析，结果发现三个突变体和野生型叶片的内源 H_2O_2 含量并没有显著差异。

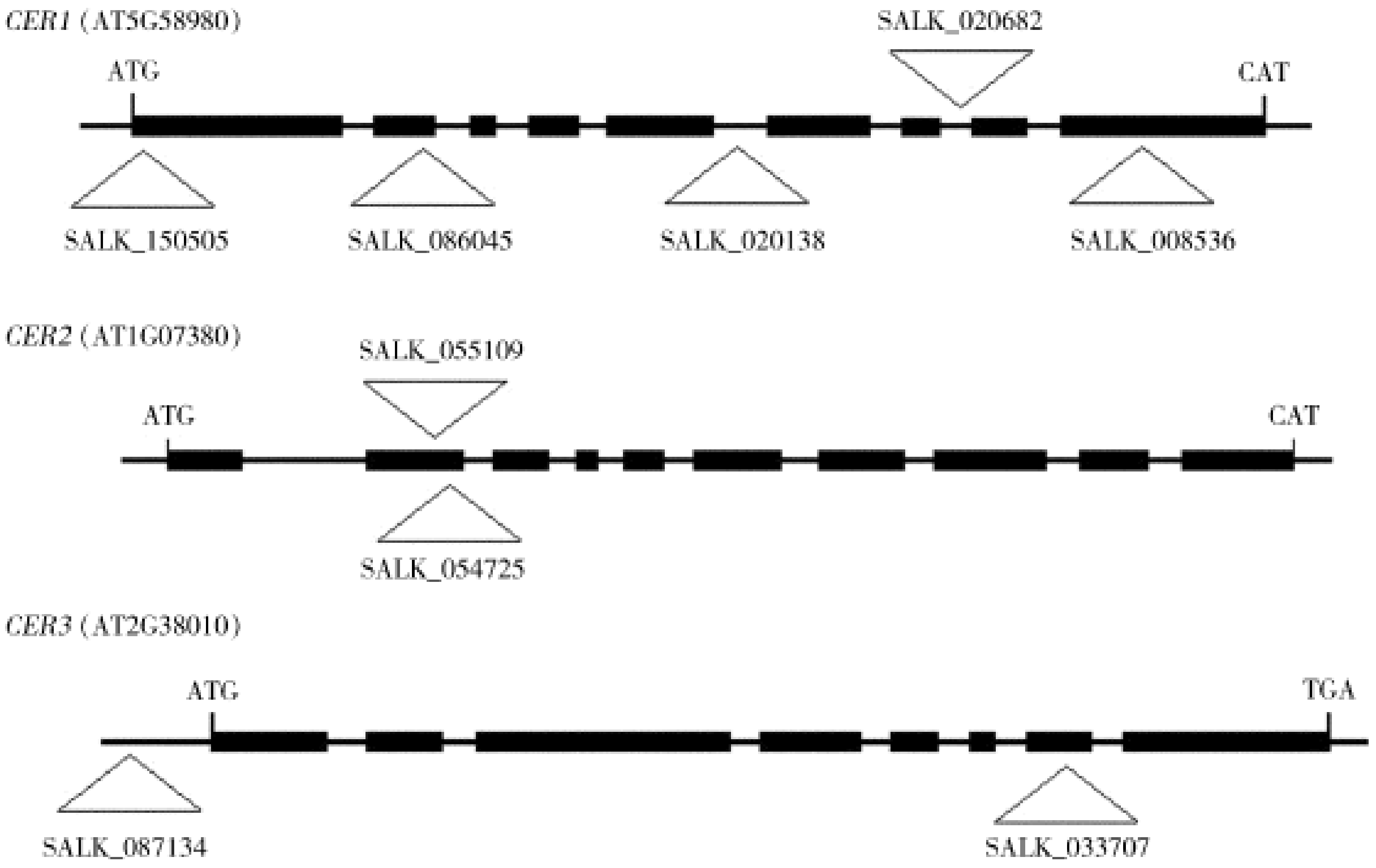

图 2　拟南芥神经酰胺酶基因突变体的 T-DNA 插入位点

Fig. 2　The T-DNA insertion sites of *AtCER* in *CER*1, *CER*2 and *CER*3

表 1　拟南芥神经酰胺酶基因 T-DNA 插入突变体的基本信息

Table 1　The basic information of *AtCER* T-DNA insertion mutants

基因名称 Gene	基因位点 Gene locus	突变体编号 Accession number	引物序列 Primer sequence
*CER*1	AT5G58980		
		SALK _ 150505	F：5′-TCTTCCTCCACTGGAAGGTT-3′ R：5′-TTGATTTCCTGCTCTTAAACCA-3′
		SALK _ 086045	F：5′-AATGTGGCAATATACTGCGAA-3′ R：5′-AGGAACAAGTACGATGCCAA-3′
		SALK _ 020138	F：5′-ACATATGCATGACGATAGTCAACT-3′ R：5′-AAATGGCATCCTCGTTACTGT-3′
		SALK _ 020682&SALK _ 008536	F：5′-ATGAGTTGCAAACCAATTGAA-3′ R：5′-TGAAGATGACGAGGTGGTCT-3′
*CER*2	AT1G07380		
		SALK _ 055109&SALK _ 054725	F：5′-TTCACGTTGTGATAGCTGGAT-3′ R：5′-CAAGTTTTTAGGAACATCCGAA-3′
*CER*3	AT2G38010		
		SALK _ 033707	F：5′-AAACAACGACTTAGAAGCTCCA-3′ R：5′-TCAACGTTATACGGACGACA-3′
		SALK _ 087134	F：5′-TCGCACGATAGATAATTGCA-3′ R：5′-ACAATGGTAGTGAAACAGCCA-3′

图 3 不同浓度 H_2O_2 处理的突变体和野生型植物叶片

Fig. 3 Effect of various concentrations of H_2O_2 on leaves from wild-type and mutant plants

2.3 H_2O_2 处理后叶片总叶绿素含量的变化

植物叶片对氧化胁迫的反应可以通过测定其叶绿素含量来鉴定 (Woo 等, 2004; Miyagawa 等, 2000)。而且前面的实验结果表明不同浓度 H_2O_2 处理突变体和野生型叶片时, 突变体出现明显的黄化现象, 因此我们进一步检测了 H_2O_2 处理后突变体和野生型叶片的总叶绿素含量的变化。由于在 30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理下突变体和野生型的黄化程度差异最明显, 因此我们分别用 0 mmol L^{-1}和 30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理来检测突变体和野生型在 H_2O_2 处理后总叶绿素含量的变化。

将突变体和野生型叶片分别放入 0 mmol L^{-1} 和 30 mmol L^{-1} H_2O_2 (含 3 mmol L^{-1} pH = 5.8 MES buffer) 的培养皿中处理, 每天选取部分叶片测量总叶绿素含量, 连续检测 3 天。结果发现 0 mmol L^{-1} H_2O_2 处理的突变体和野生型的叶片的总叶绿素含量没有明显差异。突变体和野生型的总叶绿素含量在 30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理一天后开始出现差异, 并且随着时间的延长, 差异更加明显 (图 4)。与第一天相比, 第二天突变体的叶绿素含量比野生型下降的更快: 野生型下降 11.67%, *cer*1 下降 30.75%, *cer*2 下降 20.06%, *cer*3 下降 48.49%。30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理后三个突变体的总叶绿素含量明显比野生型低很多, 而

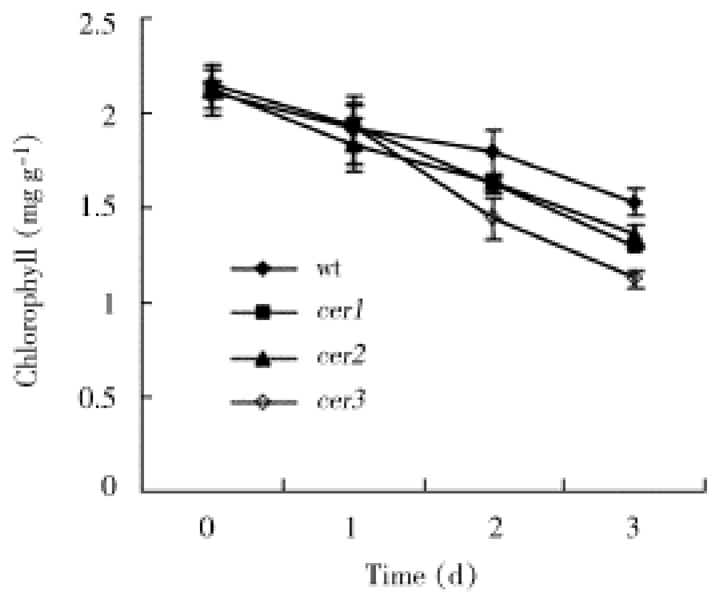

图 4　30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理对突变体和野生型叶片总叶绿素含量的影响

Fig. 4　Effect of 30 mmol L^{-1} H_2O_2 on chlorophyll content in detached leaves from wild-type and mutant plants

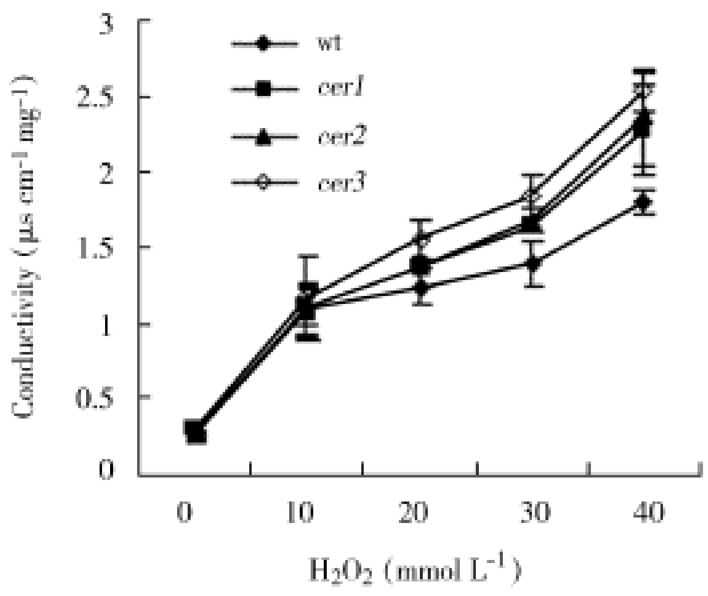

图 5　不同浓度 H_2O_2 处理对突变体和野生型叶片电导率的影响

Fig. 5　Effects of various concentrations of H_2O_2 on relative electric conductivity in detached leaves from wild-type and mutant plants

且突变体的叶绿素含量也下降更快。结果进一步表明 *cer* 对 H_2O_2 的响应更敏感。

2.4　H_2O_2 对植物叶片电导率的影响

H_2O_2 可以直接损伤许多细胞内的生物大分子，使细胞膜遭受损害，从而加速细胞的衰老和死亡 (Kwak 等，2003)。当细胞膜受到损害时，细胞膜的选择透过性发生改变或者丧失，导致细胞内的电解质外渗，使电导率增大。因此我们进一步检测了 H_2O_2 处理后野生型和突变体的电导率。

将完全成熟的第三片叶于 0、10、20、30、40 mmol L^{-1} H_2O_2 处理一天，然后测定各个处理样本的电导率（图 5）。在 0、10 mmol L^{-1} H_2O_2 处理下突变体和野生型的电导率没有明显差异。20 mmol L^{-1} H_2O_2 处理下突变体和野生型的电导率开始出现差异，并且随着 H_2O_2 浓度的增加差异逐渐增大。在 40 mmol L^{-1} 时它们的差异最明显，wt 电导率增加了 72.37%，而 *cer*1 增加了 115.85%，*cer*2 增加了 126.92%，*cer*3 增加了 135.94%，这些数据表明 H_2O_2 处理后突变体和野生型叶片的电导率都呈上升趋势，但是突变体的电导率上升得更快。这些结果进一步表明 *cer* 突变体比野生型对 H_2O_2 的响应更加敏感。

2.5　H_2O_2 处理下植物叶片的抗氧化酶活性变化

超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）和抗坏血酸过氧化物酶（APX）等抗氧化酶也称保护酶，是植物体内活性氧的清除剂，以缓解逆境对植物的伤害，H_2O_2 代谢主要由 SOD、CAT 和 POD 控制（Grant 等，2000；Polidoros 等，2001）。为了确认 *cer* 对 H_2O_2 的敏感性是否是由于其抗氧化酶活性引起的，我们检测了突变体和野生型叶片中 4 种抗氧化酶活性：SOD、CAT、APX 和 POD。

图 6 显示了 0 mmol L^{-1} 和 30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理后突变体和野生型的 4 种抗氧化酶活性的变化。结果表明 0 mmol L^{-1} H_2O_2 处理后突变体和野生型叶片的 4 种抗氧化酶活性基本没有差异。30 mmol L^{-1} H_2O_2 处理后突变体和野生型的 SOD、CAT、APX 和 POD 酶活性都明显增强，但是突变体的 4 种抗氧化酶活性比野生型增强得更多，几乎是野生型的 1.5～3 倍。因此 *cer* 对 H_2O_2 的响应更敏感并不是由于这些抗氧化酶活性变化引起的，而很可能是因为突变体受到 H_2O_2 的伤害程度比野生型更加严重。

3　讨论

大量实验证实 H_2O_2 作为信号分子参与植物发育、逆境适应和程序性细胞死亡，分子和生化方面的证据也进一步证明 H_2O_2 和鞘脂相互作用共同参与程序性细胞死亡（Gechev and Hille，2005）。H_2O_2 通过激活鞘磷脂酶的活性，使得神经酰胺大量积累从而诱导程序性细胞死亡（Gechev and Hille，2005；Goldkorn 等，2003）。而

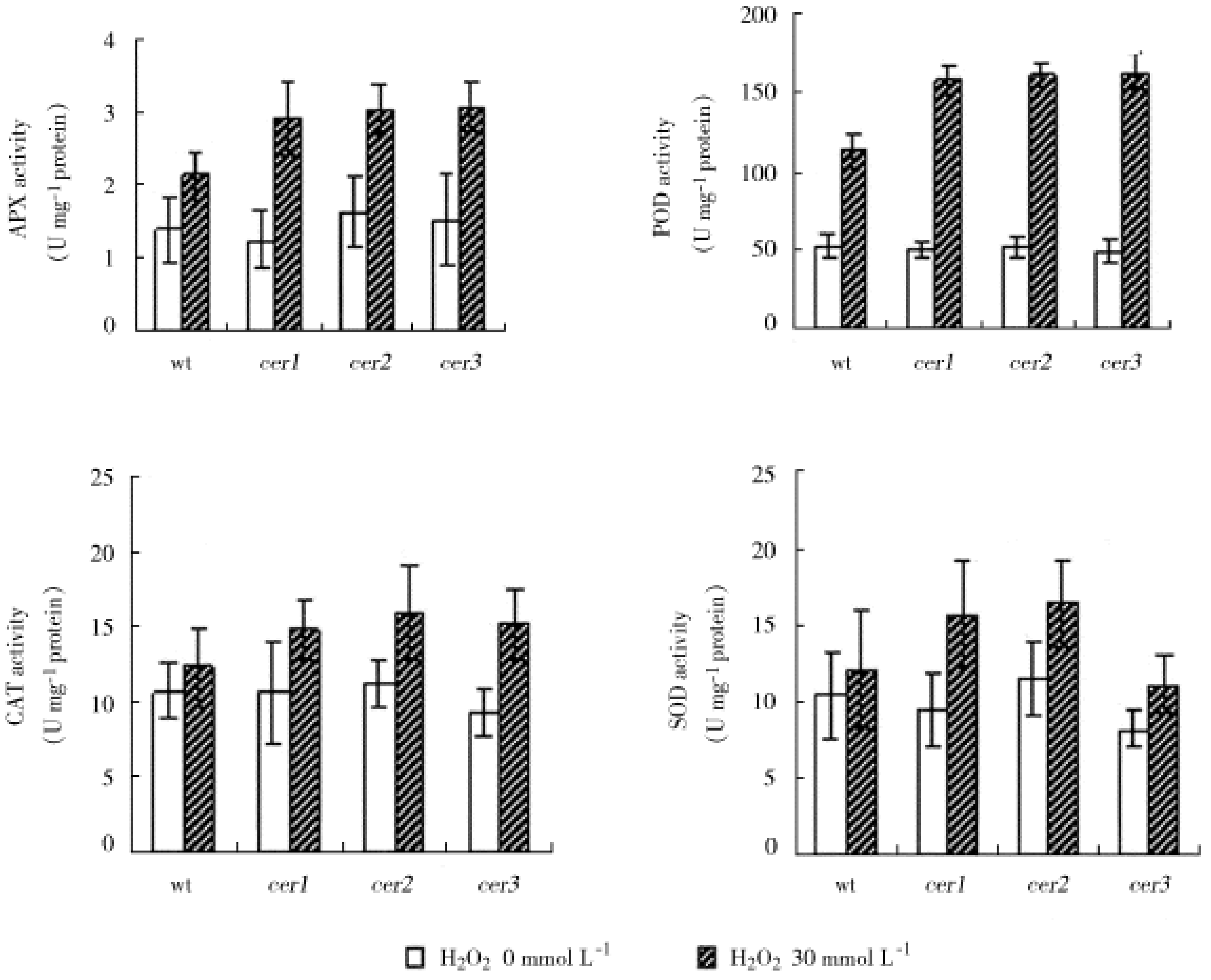

图 6　H_2O_2 处理后突变体和野生型叶片的 4 种抗氧化酶活性

Fig. 6　Effect of H_2O_2 treatment on the four species activities of antioxidant enzymes in leaves from wild-type and mutant plants

神经酰胺酶是神经酰胺代谢的关键酶，把神经酰胺水解成脂肪酸和长链基团。当神经酰胺酶减少或者缺乏时，神经酰胺的动态平衡被打破，神经酰胺过度积累，从而诱发一系列生理生化反应，诱导细胞死亡 (Liang 等，2003)。我们的实验也发现拟南芥神经酰胺酶基因的确参与了 H_2O_2 诱导的氧化胁迫反应。不同浓度 H_2O_2 处理后，*cer* 对 H_2O_2 的反应比野生型更加敏感。与野生型相比，H_2O_2 处理后突变体出现更明显的黄化现象和坏死斑点，而且其总叶绿素含量也比野生型下降更多，这表明突变体叶片受到 H_2O_2 的胁迫程度比野生型强，因此突变体对 H_2O_2 的反应比野生型更加敏感，细胞衰老速度加快。

H_2O_2 的氧化胁迫首先会损伤细胞膜，使其选择透过性发生改变或者丧失，导致细胞内电解质外渗，因此我们推测 H_2O_2 处理后植物叶片的电导率肯定会增加。为此我们检测了 H_2O_2 处理后突变体和野生型叶片的电导率，结果发现不同浓度 H_2O_2 处理后突变体和野生型叶片的电导率都增加了，但是突变体比野生型增加得更多。因而进一步证实了 H_2O_2 对突变体的细胞膜的伤害比野生型更大，所以 *cer* 对 H_2O_2 的反应更敏感。

抗氧化酶是植物体内的重要保护酶，主要清除植物体内产生的大量活性氧，缓解各种逆境产生的活性氧对植物的伤害 (Grant 等，2000；Polidoros 等，2001)。然而我们的实验发现，H_2O_2 处理后突变体的 4 种抗氧化酶活性比野生型更强，这说明突变体对 H_2O_2 的敏感性并不是由于这些抗氧化酶活性变化引起的，而很可能是因为突变体受到 H_2O_2 的伤害程度比野生型更加严重。对双突变体的进一步分析中，我们发现双突变体对 H_2O_2 的响应比单突变体更加敏感 (数据未报

道)，因此我们推测 *AtCER* 在氧化胁迫过程中的确起着重要作用。虽然目前还没有直接的证据，但是我们的实验结果表明 *AtCER* 很可能通过调节神经酰胺的代谢水平，使得神经酰胺过度积累，从而通过神经酰胺的途径来参与调控植物的抗氧化胁迫反应。

综上所述，拟南芥神经酰胺酶基因的确参与了 H_2O_2 诱导的氧化胁迫反应。但是我们并不清楚在这过程中 *AtCER* 基因与 H_2O_2 究竟是怎样相互作用，是跟植物鞘脂代谢途径有关，还是有特殊的信号途径，还需要后续实验来证明。而且植物中 H_2O_2 作为信号分子参与信号转导的机制目前仍然不清楚，H_2O_2 在生物学中的多重角色也有待进一步发现。

〔参　考　文　献〕

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ *et al.*, 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science*, 301 (5633): 653—657

Beers RF, Sizer IW, 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 195: 133—140

Bromley PE, Li YO, Murphy SM *et al.*, 2003. Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417: 219—226

Chen SY (**陈少裕**), 1991. Injury to plant cells by peroxidation of membrane lipid [J]. *Plant Physiology Communication* (**植物生理学通讯**), 27 (2): 84—90

Cheng Y, Song CP, 2006. Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells [J]. *Science China C*, 49: 1—11

Dang JL, Eietrich RA, Thomas H, 2000. Senescence and programmed cell death [A]. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL eds. Biochemistry and Molecular Biology of Plants [M]. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1044—1100

Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT *et al.*, 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress [J]. *Plant Physiology*, 127: 159—172

Dunn TM, Lynch DV, Michaelson LV *et al.*, 2004. A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Annals of Botany*, 93: 483—497

Finkel T, 2006. Intracellular redox regulation by the family of small GTPases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 8: 1857—1863

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH *et al.*, 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth [J]. *Nature*, 422: 442—446

Futerman AH, Hannun YA, 2004. The complex life of simple sphingolipids [J]. *EMBO Reports*, 5 (8): 777—782

Gechev TS, Hille J, 2005. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death [J]. *The Journal of Cell Biology*, 168 (1): 17—20

Giannopolitis CN, Ries SK, 1977. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants [J]. *Plant Physiology*, 59: 309—314

Goldkorn T, Ravid T, Medina EA, 2003. Ceramide signaling under oxidative stress [A]. In: Forman HJ, Fukuto J, Torres M eds. Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 194—222

Grant JJ, Yun BW, Loake GJ, 2000. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity [J]. *The Plant Journal*, 24: 569—582

Heung LJ, Luberto C, Poeta MD, 2006. Role of sphingolipids in microbial pathogenesis [J]. *Infection Immunity*, 74 (1): 28—39

Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J *et al.*, 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling [J]. *Biochemica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1485: 63—99

Kotchoni SO, Gachomo EW, 2006. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants [J]. *Journal Bioscience*, 31: 389—404

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM *et al.*, 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS- dependent ABA signaling in *Arabidopsis* [J]. *EMBO Journal*, 22: 2623—2633

Laloi C, Apel K, Danon A, 2004. Reactive oxygen signaling: the latest news [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 323—328

Li X, Sun DD, Chen JW *et al.*, 2007. New sphingolipids from the root of Isatis indigotica and their cytotoxic activity [J]. *Fitoterapia*, 78: 490—495

Liang H, Yao N, Song JT *et al.*, 2003. Ceramides modulate programmed cell death in plants [J]. *Genes and Development*, 17: 2636—2641

Lynch DV, Dunn TM, 2004. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function [J]. *New Phytologist*, 161: 677—702

Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S, 2000. Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from Escherichia coli [J]. *Plant Cell Physiology*, 41: 311—320

Morita Y, Perez GI, Paris F *et al.*, 2000. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelin- ase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy [J]. *Nature Medicine*, 6: 1109—1114

Mullineaux P, Ball L, Escobar C *et al.*, 2000. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defense gene expression in response to excess excitation energy? [J].

Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 355: 1531—1540

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237—1247

Park KY, Jung JY, Park J *et al.*, 2003. A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells [J]. *Plant Physiology*, 132: 92—98

Pei ZM, Murata Y, Benning G *et al.*, 2000. Calciumc hannels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells [J]. *Nature*, 406: 731—734

Polidoros AN, Mylona PV, Scandalios JG, 2001. Transgenic tobacco plants expressing the maize *Cat*2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress [J]. *Transgenic Research*, 10: 555—569

Quirino BF, Noh Y, Himelblau E *et al.*, 2000. Molecular aspects of leaf senescence [J]. *Trends Plant Science*, 5: 278—282

Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA *et al.*, 2005. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 7: 42—59

Rhee SG, 2006. Cell signaling. H_2O_2, a necessary evil for cell signaling [J]. *Science*, 312: 1882—1883

Shen WB (沈文飚), Xu LL (徐郎莱), Ye MB (叶茂炳), 1996. Study on determination of ASP activity [J]. *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), 32 (3): 203—205

Sperling P, Heinz E, 2003. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions [J]. *Biochime Biophysical Acta*, 1632: 1—15

Sung MS, Hsu YT, Hsu YT *et al.*, 2008. Hypersalinity and hydrogen peroxide upregulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* against oxidative stress [J]. *Marine Biotechnology*, 11 (2): 199—209

Venable ME, Webb-Froehlich LM, Sloan EF *et al.*, 2006. Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127: 473—480

Woo HR, Kim JH, Nam HG *et al.*, 2004. The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, *ore*1, *ore*3, and *ore*9 are tolerant to oxidative stress [J]. *Plant Cell Physiology*, 45 (7): 923—932

Wright BS, Snow JW, O'Brien TC *et al.*, 2003. Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415: 184—192

Xia P, Gamble JR, Wang L *et al.*, 2000. An oncogenic role of sphingosine kinase [J]. *Current Bioogyl*, 10: 1527—1530

Yoshioka H, Numata N, Nakajima K *et al.*, 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H_2O_2 accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* [J]. *The Plant Cell*, 15: 706—718

Zhang J, Addepalli B, Yun KY *et al.*, 2008. A polyadenylation factor subunit implicated in regulating oxidative signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS ONE*, 3 (6): e2410

Zhang WH, Wang CX, Qin CB *et al.*, 2003. The oleate-stimulated phospholipase D, PLDδ and phosphatidic acid decrease H_2O_2-induced cell death in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 15: 2285—2295

Zhang X, Zhang L, Dong FC *et al.*, 2001a. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* [J]. *Plant Physiology*, 126: 1438—1448

Zhang X, Miao YC, An GY *et al.*, 2001b. K^+ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells [J]. *Cell Research*, 11: 195—202